

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-235566

(P2003-235566A)

(43) 公開日 平成15年8月26日 (2003.8.26)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 4
1/21		9/48	4 B 0 5 0
9/48		C 1 2 P 13/04	4 B 0 6 4
C 1 2 P 13/04		C 1 2 R 1: 125	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 15/00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 18 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-32837(P2002-32837)

(22) 出願日 平成14年2月8日 (2002.2.8)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年8月24日
 社団法人日本生物工学会発行の「平成13年度 (2001年)
 日本生物工学会大会講演要旨集」に発表

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72) 発明者 田原 康孝

静岡県静岡市小鹿885-46

(74) 代理人 100089244

弁理士 遠山 勉 (外2名)

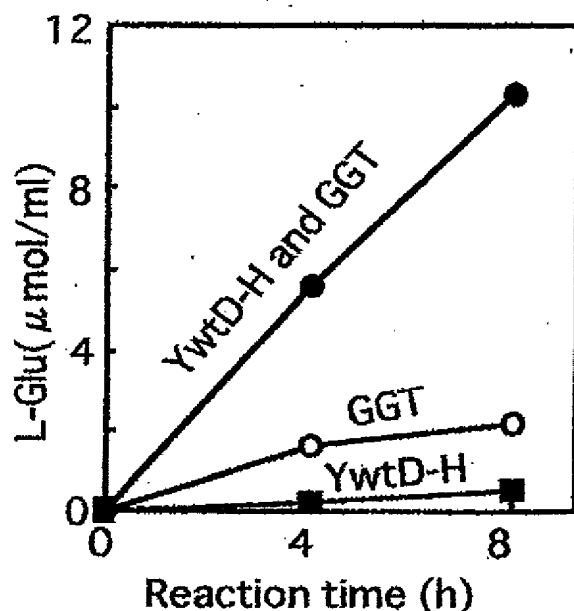
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素遺伝子およびポリ- γ -グルタミン酸の製造法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】従来技術よりも効率良くポリ- γ -グルタミン酸を発酵生産する方法の提供。

【解決手段】 γ -ポリグルタミン酸分解活性が低下又は消失させられているバチルス属に属する微生物、例えばエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解活性をコードする新規遺伝子及び/又は既知の g g t 遺伝子の発現を抑えたバチルス属細菌を液体培地に培養し、培養液中にポリ- γ -グルタミン酸を生成蓄積せしめ、これを採取することにより、効率よくポリ- γ -グルタミン酸を生産する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の性質を有するエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素。

1) 基質特異性: 分子量200kDa以上のポリ- γ -グルタミン酸に作用して、分子量10~50kDaのポリ- γ -グルタミン酸を生成する。

2) 至適pH: pH5.0

3) pH安定性: pH4.0~11.0 (4℃、16時間処理)

4) 至適温度: 45℃付近

5) 温度安定性: 35℃まで安定 (pH7.0、60分処理)

6) 金属イオン及び阻害剤の添加効果 (5mM添加): Ba^{2+} 、 Mn^{2+} によって活性化され、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} によって活性が阻害される。5mM EDTA添加では影響されない。

7) 分子量: 約46kDa (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はゲル濾過により測定される分子量)

【請求項2】 下記(A)又は(B)に示すタンパク質である請求項1記載のエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、エンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素活性を有するタンパク質。

【請求項3】 下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、エンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素活性を有するタンパク質。

【請求項4】 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項3記載のDNA。

(a) 配列表の配列番号1の塩基番号41~1279からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列表の配列番号1の塩基番号41~1279からなる塩基配列を有するDNA又はこの塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、エンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項5】 前記ストリンジェントな条件が、 $1 \times SSC$ 及び0.1%SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件である請求項4記載のDNA。

【請求項6】 ポリ- γ -グルタミン酸生産能を有し、かつ、請求項1記載のエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解活性が低下又は消失するように改変されたバチルス属に属する微生物。

【請求項7】 請求項1又は2に記載のエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素をコードする遺伝子の発現が抑えられたことにより、同酵素の活性が低下又は消失するように改変された請求項6記載の微生物。

10 【請求項8】 請求項1又は2に記載のエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素をコードする遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられている請求項7記載の微生物。

【請求項9】 塩基配列中に1つ又は複数個の塩基の置換、欠失、挿入又は付加を含むことにより請求項1又は2に記載のエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素をコードする遺伝子が破壊された請求項8記載の微生物。

【請求項10】 さらに、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性が低下又は消失するように改変された請求項6記載の微生物。

20 【請求項11】 さらに、グルタミン酸合成酵素活性が低下又は消失するように改変された請求項6又は10に記載の微生物。

【請求項12】 請求項6~11のいずれか一項に記載の微生物を液体培地に培養し、培養液中にポリ- γ -グルタミン酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするポリ- γ -グルタミン酸の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、新規なエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素及びそれをコードする遺伝子、並びに同酵素活性が低下又は消失したバチルス属に属する微生物、及び同微生物を用いたポリ- γ -グルタミン酸の製造法に関する。ポリ- γ -グルタミン酸は、食品、化粧品、医療品などの分野で有用である。

【0002】

【従来の技術】 ポリ- γ -グルタミン酸は、納豆の糸引きの主体物質として知られており、食品、化粧品、医療品などの多くの分野で、種々の用途があるものと期待されている。そして、ポリ- γ -グルタミン酸は、主にポリ- γ -グルタミン酸生産能を有する微生物、例えば、バチルス属の菌株を培養してその培養物から採取することにより製造されている(月刊組織培養、16巻、No.10、369~372頁、1990年参照)。

【0003】 微生物の発酵によるポリ- γ -グルタミン酸の生産量を増大させるための方法として、ポリ- γ -グルタミン酸生産能を有し、低アンモニア生産性の納豆菌変異株を培養する方法(特開平8-154616号)、醤油麹若しくはその抽出物、醤油醸造物又はそれらの混合物を含有する培地で、ポリ- γ -グルタミン酸生産能を有する微生物を培養する方法(特開平8-24

2880号)、ポリー γ -グルタミン酸生産能を有し、かつグルタミン酸合成酵素活性が欠損若しくは減少した変異株を培養する方法(特開2000-333690号)などが開発されている。しかし、これらの方法においては、培養時間を延ばすと、いったん生成したポリー γ -グルタミン酸が分解されて、ポリー γ -グルタミン酸の蓄積が低下するという問題点がある。

【0004】一方、これまでポリー γ -グルタミン酸を分解する活性を示す酵素としては、バチルス属の菌が生産する γ -グルタミルトランスぺプチダーゼが知られている(Y. Ogawa, H. Hosoyama, M. Hamano & H. Motai, Agric. Biol. Chem. (1991)55, p.2971-2977, K. Xu & M. A. Strauch, J. Bacteriol. (1996) 178, p.4319-4322)。しかしながら、この酵素はポリー γ -グルタミン酸を末端から順次切断し、グルタミン酸を遊離させるエキソ型の酵素であるため、実際に分子量100万以上のポリー γ -グルタミン酸の分解に寄与しているのかどうかは不明であった。また、ポリー γ -グルタミン酸を内部から切断するエンド型の γ -ポリグルタミン酸分解酵素としてはミロセシウム(*Mycrothecium*) 20 属の微生物の酵素が報告されているが(特開平5-304958号)、本酵素によるポリー γ -グルタミン酸の分解産物は、2~4個のグルタミン酸が γ -グルタミル結合したオリゴマーであるため、本酵素が分子量100万以上のポリー γ -グルタミン酸の分解に寄与するかどうかは不明であった。

【0005】一方、バチルス属細菌の産生するエンド型のポリー γ -グルタミン酸分解酵素については、従来全く知られておらず、ポリー γ -グルタミン酸分解酵素の活性が抑えられたバチルス属微生物を用いたポリー γ - 30 グルタミン酸生産についての報告はなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明が目的とするところは、従来技術よりも効率よくポリー γ -グルタミン酸を発酵生産する方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】最近、広く実験微生物として使用されている枯草菌バチルス・ズブチリス 168株の全ゲノム配列が公表された(Nature (1997) 390, p.249-256)。そのテーブルにはポリー γ -グルタミン酸分解酵素と同定された遺伝子は記載されていなかったが、本発明者は、このゲノム配列を詳細に解析して、機能未知のywtD遺伝子が既知のエンド型ペプチダーゼと部分的に高い相同性を示すことを見いだした。そこで本発明者は、バチルス・ズブチリスのywtD遺伝子は新規なポリー γ -グルタミン酸分解酵素遺伝子であり、バチルス属微生物を用いてポリー γ -グルタミン酸を生産する際に大きく影響を与えるものと推定し、当該遺伝子の機能解明を試みた結果、ywtD遺伝子がエンド型 50 ポリー γ -グルタミン酸分解酵素遺伝子であることを実

証することに成功した。そして、ポリー γ -グルタミン酸生産菌である納豆菌バチルス・ズブチリスIFO16449株においてこの遺伝子の発現を抑え、また、エキソ型ポリー γ -グルタミン酸分解活性があることが既知である γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ遺伝子(ggt遺伝子)の発現を併せて抑えることにより、ポリー γ -グルタミン酸生産能が顕著に向上することを見いだした。さらに、グルタミン酸合成酵素活性を欠損させることによってポリー γ -グルタミン酸生産性を向上させたバチルス・ズブチリスUT-1株(特開2000-333690号)においても、これら2つのポリー γ -グルタミン酸分解酵素遺伝子の発現を抑えることにより、ポリー γ -グルタミン酸生産能が顕著に向上することを見だし、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち本発明は、以下のとおりである。

(1) 下記の性質を有するエンド型ポリー γ -グルタミン酸分解酵素。

1) 基質特異性：分子量200kDa以上のポリー γ -グルタミン酸に作用して、分子量10~50kDaのポリー γ -グルタミン酸を生成する。

2) 至適pH：pH5.0

3) pH安定性：pH4.0~11.0(4℃、16時間処理)

4) 至適温度：45℃付近

5) 温度安定性：35℃まで安定(pH7.0、60分処理)

6) 金属イオン及び阻害剤の添加効果(5mM添加)：Ba²⁺、Mn²⁺によって活性化され、Cu²⁺、Ni²⁺によって活性が阻害される。5mMEDTA添加では影 30 響されない。

7) 分子量：約46kDa(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はゲル濾過により測定される分子量)

(2) 下記(A)又は(B)に示すタンパク質である

(1)のエンド型ポリー γ -グルタミン酸分解酵素。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、エンド型ポリー γ -グルタミン酸分解酵素活性を有するタンパク質。

【0009】(3) 下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、エンド型ポリー γ -グルタミン酸分解酵素活性を有するタンパク

質。

(4) 下記(a)又は(b)に示すDNAである(3)のDNA。

(a) 配列表の配列番号1の塩基番号41～1279からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列表の配列番号1の塩基番号41～1279からなる塩基配列を有するDNA又はこの塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、エンド型ポリγ-グルタミン酸分解酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(5) 前記ストリンジェントな条件が、 $1 \times \text{SSC}$ 及び0.1% SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件である(4)のDNA。

【0010】(6) ポリγ-グルタミン酸生産能を有し、かつ、(1)のエンド型ポリγ-グルタミン酸分解活性が低下又は消失するように改変されたバチルス属に属する微生物。

(7) (1)又は(2)のエンド型ポリγ-グルタミン酸分解酵素をコードする遺伝子の発現が抑えられたことにより、同酵素の活性が低下又は消失するように改変された(6)の微生物。

(8) (1)又は(2)のエンド型ポリγ-グルタミン酸分解酵素をコードする遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられている(7)の微生物。

(9) 塩基配列中に1つ又は複数個の塩基の置換、欠失、挿入又は付加を含むことにより(1)又は(2)に記載のエンド型ポリγ-グルタミン酸分解酵素をコードする遺伝子が破壊された(8)の微生物。

(10) さらに、γ-グルタミルトランスベプチダーゼ活性が低下又は消失するように改変された(6)の微生物。

(11) さらに、グルタミン酸合成酵素活性が低下又は消失するように改変された(6)又は(10)の微生物。

【0011】(12) (6)～(11)のいずれかの微生物を液体培地に培養し、培養液中にポリγ-グルタミン酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするポリγ-グルタミン酸の製造法。

【0012】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】<1>ポリγ-グルタミン酸分解酵素遺伝子を含むDNA断片の取得

本発明のポリγ-グルタミン酸分解酵素遺伝子(ywtD遺伝子)を含むDNA断片の取得は、バチルス・ズブチリスの入手可能な株、例えばIFO16449株から以下のようにして行うことができる。まず、バチルス・ズブチリスIFO16449株の染色体DNAより、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法(以下、「PCR法」と記す)を用いて、バチルス・ズブチリス168株で既に塩基配列が公知となっている機能未知のywtD

遺伝子と相同な遺伝子を含むDNA断片を得る。得られたDNA断片をエシェリヒア・コリ菌体内で自律増殖可能なプラスミドベクターと連結して組換えDNAを作製し、これをエシェリヒア・コリのコンピテントセルに導入する。得られた形質転換体を液体培地に培養し、増殖した菌体から組換えDNAを回収する。回収した組換えDNAに含まれるDNA断片の全塩基配列をダイデオキシ法(F. Sanger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (1977) p.5463参照)により決定し、DNAの構造解析を行い、プロモーター、オペレーター、SD配列、開始コドン、終始コドン、オープン・リーディング・フレームなどの存在位置を決定する。

【0014】本発明のポリγ-グルタミン酸分解酵素遺伝子は、配列表配列番号1に示される塩基配列の塩基番号41～43のGTGから1277～1279のCAAに至る配列を有する。本遺伝子は、配列表配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するエンド型ポリγ-グルタミン酸分解酵素をコードする。本発明の遺伝子は、配列表配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するエンド型ポリγ-グルタミン酸分解酵素をコードするものであればよく、その塩基配列は上記のものに限定されない。コード領域において各アミノ酸をコードするコドンと同じアミノ酸をコードする他の等価のコドンに置換したものであってもよい。さらに、前記アミノ酸配列において、エンド型ポリγ-グルタミン酸分解活性を実質的に損なわない1つ又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するエンド型ポリγ-グルタミン酸分解酵素をコードするものであってもよい。ここで、「複数」とは、エンド型ポリγ-グルタミン酸分解酵素の立体構造におけるアミノ酸残基の位置や種類によっても異なるが、通常2～200個、好ましくは2～100個、さらに好ましくは2～50個、最も好ましくは2～10個である。

【0015】このような置換、欠失、挿入又は付加を有するエンド型ポリγ-グルタミン酸分解酵素をコードする遺伝子は、バチルス・ズブチリスの変種、自然突然変異株又は人為突然変異株、バチルス・ズブチリス以外のバチルス属微生物から取得され得る。また、置換、欠失、付加又は挿入を有するエンド型ポリγ-グルタミン酸をコードする変異遺伝子は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するエンド型ポリγ-グルタミン酸をコードする遺伝子をインビトロ変異処理、あるいは部位特異的変異処理することによっても取得され得る。これらの突然変異処理は、後述するような当業者に周知の方法によって行うことができる。このようにして得た変異遺伝子を、適当な細胞で発現させ、発現産物のエンド型ポリγ-グルタミン酸分解酵素活性を後述の方法で調べることにより、本発明のエンド型ポリγ-グルタミン酸分解酵素と実質的に同一のタンパク質をコードする遺伝子が得られる。

【0016】また、変異遺伝子またはこれを保持する細胞から、配列表の配列番号1に示される塩基番号41から1279の塩基配列を有するDNA、又はこの塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、エンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、本発明のエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素と実質的に同一のタンパク質をコードする遺伝子が得られる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成される条件をいう。この条件は個々の配列のGC含量や繰り返し配列の有無などに依存するため明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA分子同士、例えば65%以上の相同性を有するDNA分子同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA分子同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0017】プローブとして、配列番号1の塩基配列の一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、配列番号1の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、配列番号1の塩基配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられる。

【0018】上記のような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中でストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれる可能性があるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素活性を測定することによって容易に取り除くことができる。

【0019】本発明のエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素は、下記の性質を有する。

1) 基質特異性：分子量200kDa以上のポリ- γ -グルタミン酸に作用して、分子量10～50kDaのポリ- γ -グルタミン酸を生成する。

【0020】2) 至適pH：pH5.0

3) pH安定性：pH4.0～11.0(4℃、16時間処理)

4) 至適温度：45℃付近

5) 温度安定性：35℃まで安定(pH7.0、60分処理)

6) 金属イオン及び阻害剤の添加効果(5mM添加)： Ba^{2+} 、 Mn^{2+} によって活性化され、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} によって活性が阻害される。5mM EDTA添加では影

響されない。

7) 分子量：約46kDa(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はゲル濾過により測定される分子量)

【0021】本発明のエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素は、配列表配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するものの他、当該アミノ酸配列においてエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解活性を実質的に損なわない1つ又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を有するものであってもよいことは、上述の通りである。

【0022】このようなエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素は、本発明のエンド型ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素(ywtD遺伝子)を有するバチルス・ズブチリスの入手可能な株、例えばIFO16449株、又は当該遺伝子を導入した宿主細胞を適当な培地に培養し、得られた菌体の抽出物又は培養液から、硫酸アンモニウム沈殿、エタノール沈殿、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等を適宜組み合わせることにより得ることができる。

【0023】<2>ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素遺伝子の発現が抑制されたバチルス属微生物の造成
本発明のバチルス属微生物は、細胞中のポリ- γ -グルタミン酸分解活性が低下又は消失させられているバチルス属に属する微生物である。バチルス属微生物の具体例については、後述する。細胞中のポリ- γ -グルタミン酸分解活性の低下又は消失は、例えば、上記のywtD遺伝子の発現を抑えることによって行われる。また、エキソ型ポリ- γ -グルタミン酸分解活性を示すことが公知であるggt遺伝子の発現を同時に抑えることが望ましい。また、これらの遺伝子によりコードされるポリ- γ -グルタミン酸分解酵素の構造を改変して、比活性を低下又は消失させることによって、細胞中のポリ- γ -グルタミン酸分解活性を低下又は消失させることができる。

【0024】ywtD遺伝子及びggt遺伝子の発現を抑えるための手段としては、例えば、これらの遺伝子のプロモーター配列中に1つ又は複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を起こさせ、プロモーター活性を低下させることによって転写レベルで遺伝子の発現を抑える方法がある(M. Rosenberg & D. Court, An. Rev. Genetics (1979) 13, p.319, P. Youderian, S. Bouvier & M. Susskind, Cell (1982) 30, P.843-853)。また、これらの遺伝子の発現は、SD配列と開始コドンとの間の領域中に1つ又は複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を起こさせることによって、翻訳レベルで抑えることができる(J. J. Dunn, E. Buzash-Pollert & F. W. Studier, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. (1978) 75, P.2743参照)。ま

た、ポリ-γ-グルタミン酸分解酵素の比活性を低下又は消失させるには、各ポリ-γ-グルタミン酸分解酵素遺伝子のコーディング領域の中の塩基配列中に1つ又は複数の塩基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を起こさせることによってコーディング領域を改変又は破壊する方法がある。塩基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を起こさせる遺伝子としては、ywtD遺伝子及びggg遺伝子に加え、コードするポリ-γ-グルタミン酸分解酵素活性を実質的に損なわない1つ又は複数のアミノ酸残基の置換、欠失又は挿入を有するywtD遺伝子又はggg遺伝子でもよい。

【0025】遺伝子中に塩基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を起こさせるには、具体的には、部位特異的変異法(W. Kramer & H. J. Frits, *Methods in Enzymology*, (1987) 154, p.350)や、次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等の化学薬剤により処理する方法(D. Shortle & D. Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1978) 75, p.270)が挙げられる。部位特異的変異法は、合成オリゴヌクレオチドを用いる方法であり、任意の限定された塩基対だけに、任意の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を導入できる手法である。この方法を利用するには、まず、クローン化され、DNA塩基配列が決定されている目的遺伝子を持つプラスミドを変性させて1本鎖を調製する。次に、変異を起こさせたい部分に相補的な合成オリゴヌクレオチドを合成するが、この時合成オリゴヌクレオチドを完全に相補的な配列にせず、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加又は逆位を持つようにしておく。その後1本鎖DNAと任意の塩基置換、欠失、挿入、付加又は逆位を持つ合成オリゴヌクレオチドをアニールさせ、さらにDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントとT4リガーゼを用いて完全な2本鎖プラスミドを合成し、これをエシェリヒア・コリのコンピテントセルに導入する。このようにして得られた形質転換体の幾つかは、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加又は逆位が固定された遺伝子を含むプラスミドを持っている。遺伝子に変異を導入し、改変又は破壊することができる同様な手法には、リコンビナントPCR法(PCR Technology, Stockton press(1989))がある。

【0026】また、化学薬剤処理を用いる方法は、目的の遺伝子を含むDNA断片を直接次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等で処理することによりDNA断片中にランダムに塩基置換、欠失、挿入、付加又は逆位を持つ変異を導入する方法である。

【0027】以上のようにして取得した変異が導入されて改変又は破壊された遺伝子を、バチルス属微生物の染色体上の正常な遺伝子と置換することにより、細胞中のywtD遺伝子及びggg遺伝子の発現を抑えることができる。遺伝子の置換の方法としては、相同性組換えを利用した方法(Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press(1972)、S. Matsu

yama & S. Mizushima, *J. Bacteriol.* (1985) 162, p.1196)がある。相同性組換えは、バチルス属微生物が一般的に持つ能力であり、染色体上の配列と相同性を有する配列を持つプラスミド等が菌体内に導入されると、ある頻度で相同性を有する配列の箇所では組換えを起こす。これにより変異が導入された遺伝子の方が染色体上に固定され、元の正常な遺伝子と置換した株が得られる。このような菌株を選択することにより、塩基置換、欠失、挿入、付加又は逆位を持つ変異が導入されて改変又は破壊された遺伝子が染色体上の正常な遺伝子と置換された菌株を取得することができる。

【0028】遺伝子の置換を行うバチルス属微生物は、ポリ-γ-グルタミン酸生産能を有する微生物である。ポリ-γ-グルタミン酸生産能を有するバチルス属微生物は、例えば、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)、バチルス・リケニホルミス(*Bacillus licheniformis*)、バチルス・アンスラシス(*Bacillus anthracis*)、バチルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)などが挙げられる。さらに具体的には、例えば、バチルス・ズブチリスIFO3335、バチルス・ズブチリスIFO3336(M. Kunikida, and A. Goto (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 867-872)、バチルス・ズブチリスIFO16449、バチルス・リケニホルミスATCC9945(F. A. Troy (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 305-315)など、あるいは通常納豆製造に使用されている宮城野菌、高橋菌、旭川菌、松村菌、成瀬菌などの市販のものなどを挙げることができる。また、これらの菌株から育種によりポリ-γ-グルタミン酸生産能を向上させたバチルス属微生物においてポリ-γ-グルタミン酸分解酵素遺伝子の発現を抑えてもよい。ポリ-γ-グルタミン酸生産能を向上させたバチルス属微生物は、例えば、グルタミン酸合成酵素遺伝子(gltA遺伝子)の破壊によりその発現を抑えることにより取得することができる(特開2000-333690)。

【0029】ywtD遺伝子及びggg遺伝子に変異を導入して改変又は破壊するためのその他の方法としては、当該遺伝子を有するバチルス属微生物の菌体にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンや亜硝酸等の化学薬剤又は紫外線、放射線照射等の処理を施すことにより遺伝的に変異させる方法もある。

【0030】後述の実施例においては、ポリ-γ-グルタミン酸分解酵素遺伝子の機能が破壊されたバチルス・ズブチリス株の造成は、そのコーディング領域の一部を欠失させ、代わりに薬剤耐性遺伝子を挿入したポリ-γ-グルタミン酸分解酵素遺伝子を、上記の相同性組換えを利用した方法により、バチルス・ズブチリスの染色体上のポリ-γ-グルタミン酸分解酵素遺伝子と置換することにより行った。

【0031】なお、1つの菌株において本発明のywtD遺伝子のみを発現を抑えることもできるし、ywtD遺伝子とggt遺伝子の両方の発現を抑えることもできる。本発明において、好ましいのは、ywtD遺伝子及びggt遺伝子の両方の発現を抑えた菌株である。また、さらに好ましいのは、これらの遺伝子に加えて、gltA遺伝子の発現を抑えた菌株である。

【0032】＜3＞ポリーγ-グルタミン酸分解酵素遺伝子の発現が抑制されたバチルス属微生物を用いたポリーγ-グルタミン酸の生産

上記のようにして取得したポリーγ-グルタミン酸分解酵素遺伝子の発現が抑制されたバチルス属微生物を培養することにより、培養液中に著量のポリーγ-グルタミン酸が生成蓄積される。ポリーγ-グルタミン酸の蓄積量は、ポリーγ-グルタミン酸分解活性があることが知られているggt遺伝子の発現を抑えることだけでも増加するが、本発明のポリーγ-グルタミン酸分解酵素遺伝子の発現を抑えることは、ポリーγ-グルタミン酸の蓄積量の向上により有効であり、また、ggt遺伝子と本発明のポリーγ-グルタミン酸分解酵素遺伝子の両方の発現を抑えた菌株を用いることにより、ポリーγ-グルタミン酸の生産にとって好ましい結果が得られる。

【0033】ポリーγ-グルタミン酸生産のために使用される培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養源を含有する通常の培地であるが、培地にグルタミン酸又はその金属塩、例えば、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸カリウムなどを含有させると、ポリーγ-グルタミン酸が効率よく生産されるので特に好ましい。培地成分の具体例としては、次のようなものを適宜組み合わせたものが用いられる。

【0034】まず、炭素源として、ブドウ糖、果糖、蔗糖、マルトース、粗糖類、糖蜜類（例えば、甜菜糖蜜、甘藷糖蜜）、各種澱粉類（例えば、タピオカ、サゴヤシ、甘藷、馬鈴薯、トウモロコシ）又はその酸若しくは酵素糖化液など、あるいはそれらの2種以上を適宜組み合わせたものが用いられる。

【0035】また、窒素源として、グルタミン酸、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸カリウム、醤油麴若しくはその抽出物、醤油又は醤油のおりなどの醤油醸造物又はそれらの混合物、ペプトン、大豆粉、コーンステープリカー、酵母エキス、肉エキス、大豆そのもの又は脱脂大豆若しくはそれらの粉体又は粒体又はそれらの抽出液、尿素などの有機窒素類、硫酸、硝酸、塩酸、炭酸などのアンモニウム塩類、アンモニアガス、アンモニア水などの無機窒素類など、あるいはそれらの2種以上を適宜組み合わせたものなどが用いられる。

【0036】また、上記の炭素源、窒素源に加えて、微生物の生育に必要な各種無機塩類、例えば、カルシウム、カリウム、ナトリウム、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛などの硫酸塩類、塩酸塩類、リン酸塩類、

酢酸塩類、あるいはアミノ酸類、ビタミン類などが用いられる。アミノ酸類としては、前記したグルタミン酸のほかに、必要によりアスパラギン酸、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、ヒスチジンなど、またビタミン類としてはビオチン、サイアミンなどを用いることができる。

【0037】また、固体培養の場合の培地素材としては、例えば蒸煮した大豆、大麦、小麦、そば、トウモロコシ又はそれらの混合物、及びそれらにグルタミン酸又はその金属塩を添加したものが好適なものとして用いられる。

【0038】ポリーγ-グルタミン酸分解酵素遺伝子の発現が抑制されたバチルス属微生物を培養するには、前記の培地を通常の方法、例えば110～140℃、8～15分で殺菌した後、培地に微生物を添加する。液体培養する場合には、振とう培養、通気攪拌培養などの好気的条件下で行なうことが望ましい。その際の培養温度は、25～50℃、好ましくは37～42℃が適当である。

【0039】また、培地のpHは、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、又はそれらの水溶液などによって調整し、pH5～9、好ましくはpH6～8で培養するのが望ましい。

【0040】また、培養期間は、通常2～4日間程度でよい。また、固体培養の場合においても前記液体培養の場合と同様に、培養温度は25～50℃、好ましくは37～42℃、培養時のpHは5～9、好ましくはpH6～8が採用される。このようにして培養すると、ポリーγ-グルタミン酸は、主として菌体外に蓄積されて培養物中に含まれる。

【0041】この培養物からポリーγ-グルタミン酸を分離、採取するには、公知の方法、例えば、（1）固体培養物から20%以下の食塩水により抽出分離する方法（特開平3-30648号）、（2）硫酸銅による沈殿法（Throne, B. C., C. C. Gomez, N. E. Noues and R. D. Housevright: J. Bacteriol., 68巻、307頁、1954年）、（3）アルコール沈殿法（R. M. Vard, R. F. Anderson and F. K. Dean: Biotechnology and Bioengineering, 5巻、41頁、1963年、沢純彦、村川武雄、村尾沢夫、大亦正次郎：農化、47巻、159～165頁、1973年、藤井久雄：農化、37巻、407～412頁、1963年など）、（4）架橋化キトサン成形物を吸着剤とするクロマトグラフィー法（特開平3-244392号）、（5）分子限外濾過膜を使用する分子限外濾過法、（6）前記（1）～

（5）を適宜組合せた方法などが採用できる。このようにして分離、採取したものは、必要により公知の方法で濃縮、熱風乾燥、凍結乾燥などの操作を施して、ポリー

10

20

30

40

50

γ-グルタミン酸の含有液、又は粉末としてもよい。

【0042】

【実施例】以下に実施例を示して本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれらの例によってなんら限定されるものではない。

【0043】

【実施例1】(バチルス・ズブチリスIFO16449株のywtD遺伝子のクローニング、遺伝子産物の精製および性質検討)

(1) バチルス・ズブチリスIFO16449株のywtD遺伝子の取得

バチルス・ズブチリスのデータバンク中のywtD遺伝子の配列を基に下記のプライマーを合成した。

【0044】(フォワード)

5'-CGA TCC GTT AAA ACT GCA AAA AGA GG (配列番号3)

(リバース)

5'-TTT CTC GAG TTG CAC CCG TAT ACT TC (配列番号4)

【0045】上記プライマーを用いてバチルス・ズブチリスIFO16449株の染色体DNAを鋳型にして、PCR法を用いて約1.3kbpのywtD遺伝子断片を増幅した。この断片を制限酵素BamHIおよびXhoI(宝酒造社製)で切断し、1%アガロースゲルで電気泳動して増幅断片を回収した。この1.3kbの断片をpET23a(+)(NOVAGEN社製)のBamHIおよびXhoIサイトへ挿入し、C末端にヒスチジンタグの融合したタンパク質として発現させるための発現用プラスミド(以下、「pNDH」という)を作製した。

【0046】pNDH中の挿入断片の塩基配列を解析した結果を配列表配列番号1に、本遺伝子断片中のywtD遺伝子のコードするエンド型ポリ-γ-グルタミン酸分解酵素のアミノ酸配列を配列表配列番号2に示した。バチルス・ズブチリスIFO16449株由来のywtD遺伝子の配列はバチルス・ズブチリス168株のywtD遺伝子の配列(Nature(1997)390, p.249-256, Subtilist database accession number BG12535)とアミノ酸配列のレベルで99%相同であった。

【0047】(2) バチルス・ズブチリスIFO16449株のywtD遺伝子産物の発現と精製
次に、C末端にヒスチジンタグの結合したywtD遺伝子産物(H-Ywt)を大腸菌で大量発現させ、精製酵素標品を調製した。常法によりプラスミドpNDHで大腸菌(E.coli)BL21(DE3)株(ノバジェン社製)を形質転換し、プラスミドpNDHを保持するE.coli BL21/pNDH株を得た。これをアンピシリン50μg/mlを含有するLB培地(1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0)100mlに接種し、37℃で培養した。6

00nmの吸光度が0.5まで菌が生育した時点で、0.4mMのIPTG(イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド)(宝酒造社製)を添加して、さらに5時間培養した。

【0048】培養液から遠心分離で回収した菌体を5mlの50mMリン酸バッファー(pH7.0)に懸濁し、4℃で5分間超音波処理を行って菌体を破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。これを500mMのNaClおよび10mMのイミダゾールを含む20mMリン酸バッファー(pH7.5)で平衡化したHiTrap chelating Sepharoseカラム(担体1ml、アマシヤムファルマシアバイオテック社製品)に吸着させた。カラムを同緩衝液で洗浄後、500mMのNaClと、50mM又は100mMのイミダゾールを含む20mMリン酸バッファー(pH7.5)によるステップワイズ溶出で酵素を溶出した。

【0049】活性画分を集め、限外ろ過により濃縮し、150mMのNaClを含む50mMリン酸バッファー(pH7.0)で平衡化したSephacryl S-200カラム(1.5×60cm、アマシヤムファルマシアバイオテック社製品)に注入し、同じバッファーにより流速0.5/minにて溶出した。以上の操作によって、精製H-YwtDタンパク0.5mgを調製できた。この酵素標品は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動において均一であった。

【0050】(3) バチルス・ズブチリスIFO16449株由来ywtD遺伝子産物の性質検討

精製酵素標品を用いて、酵素の性質検討を行った。反応の基質には、国中らの方法(Biosci. Biotech. Biochem.(1992)56, p1031-1035)に従いバチルス・ズブチリスIFO16449株の培養液から調製した平均分子量50kDa以上のポリ-γ-グルタミン酸を用いた。

【0051】ポリ-γ-グルタミン酸分解活性の測定は、次の条件で行った。ポリ-γ-グルタミン酸(平均分子量50万以上)4mg/ml、リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)及び酵素を含む反応液(1ml)でpH7.0、37℃で反応を行った。ニンヒドリン反応用メチルセロソルブ溶液1.2mlで反応を停止させた後、ニンヒドリン法により遊離グルタミン酸の定量を行った。この標準反応条件にて1分間に1μmolのL-γ-グルタミン酸を生成する酵素量を1ユニットと定めた。比活性はタンパク質1mgあたりのユニットとした。なお、タンパク質の定量は、堀尾らの方法(蛋白質・酵素の基礎実験法 改訂第2判、江南堂、1994年)で測定した。すなわちA液(2%Na₂CO₃を含む0.1N NaOH溶液)とB液(0.5%CuSO₄を含む1%クエン酸ナトリウム水溶液)を50:1で混合してC液を作製した。タンパク質濃度が50~300μg/mlになるように希釈したサンプル0.3mlとC液3

mlとを混合し、室温で20分間静置した。それに、2倍に希釈したフェノール試薬（和光純薬社製）を0.3ml加えて30分間静置した後、750nmの吸光度を測定した。検量線は、0~400 μ g/mlの牛血清アルブミン（和光純薬社製）を用いて作成した。

【0052】ポリ- γ -グルタミン酸分解産物の分子量は、次の条件で、HPLCによって分析した。分子量は、分子量既知のポリ- α -グルタミン酸（分子量、14kDa、32kDa、58kDa、シグマ社製）およびプルラン（分子量200kDa、東京化成工業社製）をスタンダードとして算出した。

【0053】カラム：Asahipak GF-7M HQ（7.6 \times 300mm、昭和電工社製品）
移動相：50mM リン酸バッファー（pH6.8）
流速：0.6ml/min
温度：32℃
検出：RIディテクター

【0054】まず、ニンヒドリン法にて精製酵素のポリ- γ -グルタミン酸分解活性を測定した。精製酵素90 μ gを添加して標準条件で反応を行ったところ、反応経時に伴ってポリ- γ -グルタミン酸の分解により生成するグルタミン酸が検出され、本酵素がポリ- γ -グルタミン酸分解活性を有することが示された（図1の■）。なお、2時間の反応で0.10 μ molのL-グルタミン酸が検出され、精製標品の比活性は、本方法によって9.26mU/mg proteinと測定された。

【0055】次に、HPLCにて分解産物の分子量を測定した結果を図2に示した。反応の進行に従って200kDa以上の分子量をもつポリ- γ -グルタミン酸の分子量が低下するのが確認された。24時間の反応でポリ- γ -グルタミン酸は10~50kDaの分子量まで分解された。

【0056】以上の結果から、本酵素はポリ- γ -グルタミン酸をエンド型に分解する活性を有することが明らかとなった。さらに本酵素の性質を詳細に検討したところ、本酵素は次の性質を有していた。

【0057】1) 基質特異性：分子量200kDa以上のポリ- γ -グルタミン酸に作用して、分子量10~50kDaのポリ- γ -グルタミン酸を生成する。

2) 至適pH：pH5.0

3) pH安定性：pH4.0 ~ 11.0（4℃、16時間処理）

4) 至適温度：45℃付近

5) 温度安定性：35℃まで安定（pH7.0、60分処理）

6) 金属イオン及び阻害剤の添加効果（5mM添加）：本酵素活性はBa²⁺添加によって43%、Mn²⁺添加によって10%活性化される。一方、Cu²⁺添加によって100%、Ni²⁺添加によって84%の活性阻害が認められる。5mMEDTA添加では影響されない。

7) サブユニット分子量：還元条件下でのSDS-ポリ- γ -グルタミン酸ゲル電気泳動により約46kDaと算出される。

8) 分子量：FPLC（Sephacryl S-200、アマシャム ファルマシア バイオテック社製）により約46kDaと算出される。

上記7）、8）の結果から、本酵素はモノマーであると推定される。

【0058】

10 【実施例2】（ポリ- γ -グルタミン酸分解酵素（YwtD）と γ -グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）の共存によるポリ- γ -グルタミン酸の分解

（1）パチルス・ズブチリスIFO16449株由来 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）の部分精製

パチルス・ズブチリスIFO16449株を100mlのSY培地（5%シュクロース、2%酵母エキス、0.25% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄·7H₂O、0.25% NaCl、pH7.0）に植菌して37℃で15時間培養した。遠心分離により菌体を除いた後、小川らの方法（Y. Ogawa, H. Hosoyama, M. Hamano, H. Motai, Agric. Biol. Chem. (1991) 55, p.2971-2977）に従ってPMSF（フェニルメタンスルホニルフルオリド）処理、DEAEカラムクロマトグラフィーを行い、培養上清液より γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）の部分精製を行い、部分精製GGT約15mgを調製した。

30 【0059】（2）パチルス・ズブチリスIFO16449株由来GGTによるポリ- γ -グルタミン酸の分解反応

部分精製GGTを用いて、実施例1と同様の方法にてポリ- γ -グルタミン酸の分解反応を試みた。ポリ- γ -グルタミン酸分解活性を測定したところ、反応経時に伴ってポリ- γ -グルタミン酸の分解により生成するグルタミン酸が検出された（図1の○）。部分精製GGT250 μ gを添加して標準条件で反応を行ったところ、2時間の反応で1.3 μ molのL-グルタミン酸が検出され、精製標品の比活性はニンヒドリン法によって43.3mU/mg proteinと測定された。次に、HPLCにて分解産物の分子量を測定した結果を図3に示した。GGTを用いた反応の場合には24時間の反応でもポリ- γ -グルタミン酸の分子量低下はほとんど観察されなかった。

【0060】（3）パチルス・ズブチリスIFO16449株由来YwtD-HおよびGGTの共存によるポリ- γ -グルタミン酸の分解反応

次いで実施例1で調製したYwt-H90 μ gおよび部分精製GGT250 μ gを同時に添加して、ポリ- γ -グルタミン酸の分解反応を行った。ポリ- γ -グルタミン酸分解活性を測定したところ、反応経時に伴ってポリ

ーγ-グルタミン酸の分解により生成するグルタミン酸が検出された。図1に示したようにグルタミン酸の生成量はそれぞれの酵素を単独に添加した場合に比べて顕著に増加した(図1の●)。次に、2つの酵素を同時に添加して反応した場合の分解産物の分子量を測定した結果を図4に示した。GGT単独での分解反応の場合にはほとんどポリーγ-グルタミン酸の分子量低下は観察されず、Ywt-H単独での分解反応の場合にもポリーγ-グルタミン酸は10~50kDaの分子量以下までしか分解されなかったのに対し、これら2つの酵素を同時に添加して反応した場合には24時間の反応で200kDa以上の分子量をもつポリーγ-グルタミン酸がほぼ完全に低分子化された。

【0061】この現象からポリーγ-グルタミン酸の分解は、まずywtD遺伝子産物によってエンド型で分解され、生成した低分子のポリーγ-グルタミン酸がGGTによりエキソ型で分解されてグルタミン酸のオリゴマーとモノマーに分解されるという様式で分解されていることが強く示唆され、バチルス属微生物を用いるポリーγ-グルタミン酸の発酵生産においてはこれら2つの酵

素の存在が大きく影響を与えるものと考えられた。

【0062】

【実施例3】(バチルス・ズブチリスIFO16449株のywtD遺伝子破壊株の作製)

実施例1と同様の方法で、PCRによりバチルス・ズブチリスIFO16449株のywtD遺伝子を含む1.3kb断片を増幅し、これをpUC19(宝酒造社製)のHincIIサイトへ挿入して、プラスミドpUCywtDを作製した。次いでpMUTin4MCS(バチルス ジェネティック ストックセンターより分譲)から制限酵素AccII(宝酒造社製)で切り出される1.5kb断片のエリスロマイシン耐性遺伝子(erm)断片を、pUCywtDのBglIサイトに挿入し、ywtD遺伝子破壊用プラスミドpUCΔywtDを作製した。

【0063】バチルス・ズブチリスIFO16449株を2XTY培地(1.6%ポリペプトン、1%酵母エキス、0.5% NaCl、pH7)20mlに植菌し、37℃、200rpmで1晩培養した。この培養液200μlを20mlのSPI培地(0.6% KH₂PO₄、1.4% K₂HPO₄、0.2% 硫酸アンモニウム、0.1% クエン酸ナトリウム、0.02% 硫酸マグネシウム、0.5% グルコース、0.02% カザミノ酸、0.1% 酵母エキス、50mg/ml トリプトファン、50mg/ml ロイシン)に移植して、対数増殖後期まで培養した。さらにこの培養液10mlを100mlのSPII培地(0.6% KH₂PO₄、1.4% K₂HPO₄、0.2% 硫酸アンモニウム、0.1% クエン酸ナトリウム、0.02% 硫酸マグネシウム、0.5% グルコース、75mg/ml CaCl₂、508mg/

ml MgCl₂)に移植して、37℃、200rpmで90分間振とう培養し、コンピテントセルを調製した。

【0064】調製したコンピテントセルの培養液10mlを20ml容三角フラスコに入れ、先に作製した遺伝子破壊用プラスミドpUCΔywtDを10μg添加し、37℃、120rpmで60分間培養した。培養液100μlを4μg/mlのエリスロマイシン(Em)を含む2×YTプレートに塗抹して、37℃で約15時間静置培養して生育した形質転換株(ywtD::erm株)を得た。ywtD::erm株のywtD遺伝子中にエリスロマイシン耐性遺伝子が挿入され、ywtDが破壊されていることをサザンブロットハイブリダイゼーションにより確認した。

【0065】

【実施例4】(バチルス・ズブチリスIFO16449株のywtD遺伝子破壊株によるポリーγ-グルタミン酸の生産)

バチルス・ズブチリスIFO16449株および実施例4で得たywtD遺伝子破壊株を、30mlのガンマーポリグルタミン酸生産培地(2%グルタミン酸、1% 硫酸アンモニウム、0.1% Na₂HPO₄、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄、0.02% CaCl₂、0.005% FeCl₃、0.002% MnCl₂、0.5μg/ml ビオチン、pH7.5)を含む200ml容のひだ付き三角フラスコにそれぞれ植菌し、37℃、170rpmで、48時間振とう培養した。なお、ywtD遺伝子破壊株の培養時には1μg/mlのエリスロマイシンを添加した。

【0066】培養終了後、液体培養物を5倍に希釈し、培養液中に生成したポリーγ-グルタミン酸を定量した。ポリーγ-グルタミン酸はBovarnickらの方法(M. Bovarnick, F. Eisenberg, D. O'Connell, J. Victor & P. Owases, J. Biol. Chem. (1954) p.593)に従って、サフラン法にて定量した。

【0067】培養液中のポリーγ-グルタミン酸量を測定した結果、親株のIFO16449株では4.8mg/mlの生産量であったが、ywtD遺伝子破壊株では5.4mg/mlの生産量を示し、親株に比較して1.12倍のポリーγ-グルタミン酸量生産量の増加が認められた。この結果より、ywtD遺伝子のコードするポリーγ-グルタミン酸分解酵素の活性がポリーγ-グルタミン酸の生産において大きく影響を与えることが示された。

【0068】

【実施例5】(バチルス・ズブチリスIFO16449株のggT遺伝子破壊株およびywtD、ggT遺伝子二重破壊株の作製)

小川らの方法(Y. Ogawa, D. Sugiura, H. Motai, K. Yuasa & Y. Tahara, Biosci. Biotech. Biochem. (1997), 61, p.1596-1600)に従ってバチルス・ズブチリス

I F O 1 6 4 4 9株のg g t遺伝子をpUC18（宝酒造社製）にクローニングし、プラスミドpGT2を構築した。次いでpC194（パチルス ジェネティック ストックセンターより分譲）から制限酵素NaeIおよびXhoI（宝酒造社製）で切り出される1.0kbのクロラムフェニコール耐性遺伝子（cat）断片を、pGT2のBstPIサイトに挿入し、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子（ggt遺伝子）破壊用プラスミドpUCΔggtを作製した。

【0069】実施例3と同様の方法にてパチルス・ズブチリスI F O 1 6 4 4 9株をggt遺伝子破壊用プラスミドpUCΔggtで形質転換し、相同組換えによってggt遺伝子を破壊した。プラスミドを導入した菌の培養液を5μg/mlのクロラムフェニコール（Cm）を含む2×YTプレートに塗抹して、37℃で約15時間静置培養して生育した形質転換株（ggt::cat株）を得た。小川らの方法（Y. Ogawa, H. Hosoyama, M. Hamano & H. Motai, Agric. Biol. Chem. (1991) 55, p.2971-2977）に従ってggt::cat株のγ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性を測定し、GGTが欠損していることを確認した。

【0070】次に、実施例3で用いたywtD遺伝子破壊用プラスミドpUCΔywtDを用いて、同様の方法にてggt::cat株のywtD遺伝子を破壊した。プラスミドを導入した菌の培養液を5μg/mlのクロラムフェニコールおよび1μg/mlのエリスロマイシンを含む2×YTプレートに塗抹して、37℃で約15時間静置培養して生育した形質転換株（ggt::cat+ywtD::emr株）を得た。ywtDの破壊はサザンハイブリダイゼーションにより確認した。

【0071】

【実施例6】（ggt遺伝子破壊株およびywtD、ggt遺伝子二重破壊株によるポリ-γ-グルタミン酸の生産）

パチルス・ズブチリスI F O 1 6 4 4 9株、および実施例5で得たggt遺伝子破壊株、並びにywtD、ggt遺伝子二重破壊株を、30mlのガンマーポリグルタミン酸生産培地（2%グルタミン酸、1%硫酸アンモニウム、0.1%Na₂HPO₄、0.1%KH₂PO₄、0.05%MgSO₄、0.02%CaCl₂、0.005%FeCl₃、0.002%MnCl₂、0.5μg/mlピオチン、pH7.5）を含む200ml容のひだ付き三角フラスコにそれぞれ植菌し、37℃で170rpmで、48時間振とう培養した。なお、ggt遺伝子破壊株の培養時には5μg/mlのクロラムフェニコール、ywtD、ggt遺伝子二重破壊株の培養時には1μg/mlのエリスロマイシンおよび5μg/mlのクロラムフェニコールを添加した。

【0072】培養終了後、培養液中に生成したポリ-γ-グルタミン酸を実施例4の方法で測定した結果、親株

のI F O 1 6 4 4 9株では4.8mg/mlの生産量であった。ggt遺伝子単独破壊株では約1.20倍の生産性向上効果が認められ、5.8mg/mlの生産量を示した。ywtD、ggt遺伝子二重破壊株ではそれぞれの単独破壊株よりさらに生産性が向上し、親株に比べて1.31倍の生産性で、6.3mg/mlのポリ-γ-グルタミン酸を蓄積できた。この結果より、ywtD遺伝子のコードするポリ-γ-グルタミン酸分解酵素及びggt遺伝子のコードするγ-グルタミルトランスペプチダーゼの活性がポリ-γ-グルタミン酸の生産において大きく影響を与えることが示された。

【0073】

【実施例7】（パチルス・ズブチリスI F O 1 6 4 4 9株のywtD、ggt及びgltA遺伝子三重破壊株の作成）

パチルス・ズブチリスのデータバンクのグルタミン酸合成酵素遺伝子（gltA遺伝子）の塩基配列を参考にし、下記のパライマーを合成した。

【0074】（フォワード）

5'-CTT GGA TCG AGA ACT GTA CCT G（配列番号5）

（リバース）

5'-GGC GCT GAA ATT AGG TGC TG（配列番号6）

【0075】これらのパライマーを鋳型にして、パチルス・ズブチリスI F O 1 6 4 4 9株の染色体DNAを鋳型にして、PCR法を用いて約6kbのgltA遺伝子断片を調製した。この断片を制限酵素EcoT22I（宝酒造社製）で切断し、得られた5kbの断片をpUC19（宝酒造社製）のPstIサイトに挿入してプラスミドpGOを作製した。次にコスミドLorist6（ニッポンジーン社製）から制限酵素SalIおよびBclI（宝酒造社製）で切り出される0.9Kbpのネオマイシン耐性遺伝子（neo）断片を、プラスミドpGOのNaeIサイトに挿入し、gltA遺伝子の破壊用プラスミドpGOcmを作製した。

【0076】実施例3と同様の方法にて、パチルス・ズブチリスI F O 1 6 4 4 9株および実施例4で構築したywtD、ggt遺伝子二重破壊株（ggt::cat+ywtD::emr株）を、gltA遺伝子の破壊用プラスミドpGOcmで形質転換し、相同組換えによってgltA遺伝子を破壊した。プラスミドを導入した菌の培養液100μlを5μg/mlのネオマイシン（Nm）、又は5μg/mlのネオマイシン、5μg/mlのクロラムフェニコールおよび1μg/mlのエリスロマイシンを含む2×YTプレートに塗抹して、37℃で約15時間静置培養して生育した形質転換株（gltA::neo株およびggt::cat+ywtD::emr+gltA::neo株）を得た。

【0077】

【実施例8】（ywtD、ggt及びgltA遺伝子三重破壊株によるポリ-γ-グルタミン酸の生産）

パチルス・ズブチリスIFO16449株、実施例6で得たgltA遺伝子破壊株、およびywtD、ggt、gltA遺伝子三重破壊株を、30mlのガンマーポリグルタミン酸生産培地（2%グルタミン酸、1%硫酸アンモニウム、0.1% Na₂HPO₄、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄、0.02% CaCl₂、0.005% FeCl₃、0.002% MnCl₂、0.5μg/mlビオチン、pH7.5）を含む200ml容のひだ付き三角フラスコにそれぞれ植菌し、37℃で170rpmで、96時間振とう培養した。な*10

表1 各菌株によるポリ-γ-グルタミン酸量生成量 (mg/ml)

菌株	培養時間	
	48h	96h
IFO16449株	8.09	6.65
gltA遺伝子破壊株	11.90	9.45
ywtD, ggt, gltA遺伝子三重破壊株	12.77	16.10

【0080】48時間の培養では、特開2000-333690号に示されたように、gltA遺伝子破壊株では親株のIFO16449株に比べて生産性が大きく向上した。しかしながら、培養時間を伸ばしてもポリ-γ-グルタミン酸量の蓄積量は増えず、むしろ生成したポリ-γ-グルタミン酸が分解を受けて、蓄積量は低下した。一方、ywtD、ggt、gltA遺伝子三重破壊株は、ポリ-γ-グルタミン酸の生産性が向上するだけでなく、培養時間を伸ばしてもポリ-γ-グルタミン酸量は分解されず、さらに著量のポリ-γ-グルタミン酸を生成蓄積することが可能であった。この結果より、ywtD遺伝子のコードするポリ-γ-グルタミン酸分解※

*お、gltA遺伝子破壊株の培養時には5μg/mlのネオマイシンを、ywtD、ggt、gltA遺伝子三重破壊株の培養時には1μg/mlのエリスロマイシン、5μg/mlのクロラムフェニコールおよび5μg/mlのネオマイシンを添加した。

【0078】培養開始後48時間後と、96時間後の培養液中のポリ-γ-グルタミン酸量を実施例3記載の方法で測定した結果を、表1に示した。

【0079】

【表1】

※酵素及びggt遺伝子のコードするγ-グルタミルトランスぺプチダーゼの活性が、gltA遺伝子破壊によって生産性の向上したポリ-γ-グルタミン酸生産株においても大きく影響を与えることが示された。

【0081】

【発明の効果】本発明により、従来よりも効率よくポリ-γ-グルタミン酸を発酵生産する方法が提供される。特に、好ましい実施形態では、長時間の培養においても生成したポリ-γ-グルタミン酸が分解されず、著量蓄積させることができる。

【0082】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> ポリ-γ-グルタミン酸分解酵素遺伝子およびポリ-γ-グルタミン酸の製造法

<130> P-9617

<140>

<141> 2002-02-08

<160> 6

<170> Patent In Ver. 2.0

【0083】

<210> 1

<211> 1285

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<220>

<221> CDS

<222> (41)..(1279)

23		24
<400> 1		
ggatccgtta aaactgcaaa aagaggagga gataataaaa	gtg aac aca ctg gca	55
	Val Asn Thr Leu Ala	
	1 5	
aac tgg aag aag ttt ttg ctt gtg gcg gtt atc att tgt ttt ttg gtt		103
Asn Trp Lys Lys Phe Leu Leu Val Ala Val Ile Ile Cys Phe Leu Val		
10 15 20		
cca att atg aca aaa gcg gag att gcg gaa gct gat aca tca tca gaa		151
Pro Ile Met Thr Lys Ala Glu Ile Ala Glu Ala Asp Thr Ser Ser Glu		
25 30 35		
ttg att gtc agc gaa gca aaa aac ctg ctt gga tat cag tat aaa tat		199
Leu Ile Val Ser Glu Ala Lys Asn Leu Leu Gly Tyr Gln Tyr Lys Tyr		
40 45 50		
ggc ggg gaa acg ccg aaa gag ggt ttc gat cca tca gga ttg ata caa		247
Gly Gly Glu Thr Pro Lys Glu Gly Phe Asp Pro Ser Gly Leu Ile Gln		
55 60 65		
tat gtg ttc agt aag gct gat att cat ctg ccg aga tct gta aac gac		295
Tyr Val Phe Ser Lys Ala Asp Ile His Leu Pro Arg Ser Val Asn Asp		
70 75 80 85		
cag tat aaa atc gga aca gct gta aag ccg gaa aac ctg aag ccg ggt		343
Gln Tyr Lys Ile Gly Thr Ala Val Lys Pro Glu Asn Leu Lys Pro Gly		
90 95 100		
gat att ttg ttt ttc aag aaa gag gga agc aac ggc tct gtt ccg aca		391
Asp Ile Leu Phe Phe Lys Lys Glu Gly Ser Asn Gly Ser Val Pro Thr		
105 110 115		
cat gac gcc ctt tat atc gga gac ggc caa atg gta cac agt aca cag		439
His Asp Ala Leu Tyr Ile Gly Asp Gly Gln Met Val His Ser Thr Gln		
120 125 130		
tca aaa ggg gtt atc atc acc aat tac aaa aaa agc agc tat tgg agc		487
Ser Lys Gly Val Ile Ile Thr Asn Tyr Lys Lys Ser Ser Tyr Trp Ser		
135 140 145		
gga act tat atc gga gcg aga cga atc gct gcc gat ccg gca acg gct		535
Gly Thr Tyr Ile Gly Ala Arg Arg Ile Ala Ala Asp Pro Ala Thr Ala		
150 155 160 165		
gat gtt cct gtc gtt cag gag gcc gaa aaa tat atc ggt gtc cca tat		583
Asp Val Pro Val Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Ile Gly Val Pro Tyr		
170 175 180		
gtg ttt ggc gga agc acg ccg tca gag ggc ttt gat tgc tcg ggg ctt		631
Val Phe Gly Gly Ser Thr Pro Ser Glu Gly Phe Asp Cys Ser Gly Leu		
185 190 195		
gtg caa tat gtg ttt caa cag gca ctc ggc att tat cta ccg cga tca		679
Val Gln Tyr Val Phe Gln Gln Ala Leu Gly Ile Tyr Leu Pro Arg Ser		
200 205 210		
gcc gaa cag cag tgg gca gtg ggc gag aag ata gcc cct cag aac ata		727
Ala Glu Gln Gln Trp Ala Val Gly Glu Lys Ile Ala Pro Gln Asn Ile		
215 220 225		
aag cct ggt gat gtc gtc tat ttc agc aat acg tat aaa acg gga att		775
Lys Pro Gly Asp Val Val Tyr Phe Ser Asn Thr Tyr Lys Thr Gly Ile		
230 235 240 245		
tca cat gca ggc att tat gcg ggc gca ggc agg ttc atc cag gca agc		823

25		26
Ser His Ala Gly Ile Tyr Ala Gly Ala Gly Arg Phe Ile Gln Ala Ser		
250	255	260
agg tca gaa aaa gta acc att tcc tat ttg tca gag gat tac tgg aaa		871
Arg Ser Glu Lys Val Thr Ile Ser Tyr Leu Ser Glu Asp Tyr Trp Lys		
265	270	275
tcg aag atg acg ggt att cgc cga ttt gac aac ctg aca atc ccg aaa		919
Ser Lys Met Thr Gly Ile Arg Arg Phe Asp Asn Leu Thr Ile Pro Lys		
280	285	290
gaa aat ccg att gtt tcc gaa gcg acg ctt tat gtc gga gaa gtg cct		967
Glu Asn Pro Ile Val Ser Glu Ala Thr Leu Tyr Val Gly Glu Val Pro		
295	300	305
tac aaa cag ggc gga gta aca cct gag aca gga ttt gat aca gct gga		1015
Tyr Lys Gln Gly Gly Val Thr Pro Glu Thr Gly Phe Asp Thr Ala Gly		
310	315	320
ttt gtc caa tat gta tac cag aaa gca gcc ggt att tcc ctg cct cga		1063
Phe Val Gln Tyr Val Tyr Gln Lys Ala Ala Gly Ile Ser Leu Pro Arg		
330	335	340
tac gca aca agc cag tac aat gcc gga act aag att aag aag gcg gac		1111
Tyr Ala Thr Ser Gln Tyr Asn Ala Gly Thr Lys Ile Lys Lys Ala Asp		
345	350	355
ctg aag ccg gga gac att gtg ttc ttt caa tca aca agc tta aat ccc		1159
Leu Lys Pro Gly Asp Ile Val Phe Phe Gln Ser Thr Ser Leu Asn Pro		
360	365	370
tcc atc tat atc gga aac gga caa gtt gtt cat gtc aca tta tca aac		1207
Ser Ile Tyr Ile Gly Asn Gly Gln Val Val His Val Thr Leu Ser Asn		
375	380	385
ggc gtg acc atc acc aat atg aac acg agc aca tat tgg aag gat aaa		1255
Gly Val Thr Ile Thr Asn Met Asn Thr Ser Thr Tyr Trp Lys Asp Lys		
390	395	400
tac gca gga agt ata cgg gtg caa ctcgag		1285
Tyr Ala Gly Ser Ile Arg Val Gln		
410		

【0084】

<210> 2

<211> 413

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 2

Val Asn Thr Leu Ala Asn Trp Lys Lys Phe Leu Leu Val Ala Val Ile
1 5 10 15
Ile Cys Phe Leu Val Pro Ile Met Thr Lys Ala Glu Ile Ala Glu Ala
20 25 30
Asp Thr Ser Ser Glu Leu Ile Val Ser Glu Ala Lys Asn Leu Leu Gly
35 40 45
Tyr Gln Tyr Lys Tyr Gly Gly Glu Thr Pro Lys Glu Gly Phe Asp Pro
50 55 60
Ser Gly Leu Ile Gln Tyr Val Phe Ser Lys Ala Asp Ile His Leu Pro
65 70 75 80
Arg Ser Val Asn Asp Gln Tyr Lys Ile Gly Thr Ala Val Lys Pro Glu
85 90 95

27
 Asn Leu Lys Pro Gly Asp Ile Leu Phe Phe Lys Lys Glu Gly Ser Asn
 100 105 110
 Gly Ser Val Pro Thr His Asp Ala Leu Tyr Ile Gly Asp Gly Gln Met
 115 120 125
 Val His Ser Thr Gln Ser Lys Gly Val Ile Ile Thr Asn Tyr Lys Lys
 130 135 140
 Ser Ser Tyr Trp Ser Gly Thr Tyr Ile Gly Ala Arg Arg Ile Ala Ala
 145 150 155 160
 Asp Pro Ala Thr Ala Asp Val Pro Val Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr
 165 170 175
 Ile Gly Val Pro Tyr Val Phe Gly Gly Ser Thr Pro Ser Glu Gly Phe
 180 185 190
 Asp Cys Ser Gly Leu Val Gln Tyr Val Phe Gln Gln Ala Leu Gly Ile
 195 200 205
 Tyr Leu Pro Arg Ser Ala Glu Gln Gln Trp Ala Val Gly Glu Lys Ile
 210 215 220
 Ala Pro Gln Asn Ile Lys Pro Gly Asp Val Val Tyr Phe Ser Asn Thr
 225 230 235 240
 Tyr Lys Thr Gly Ile Ser His Ala Gly Ile Tyr Ala Gly Ala Gly Arg
 245 250 255
 Phe Ile Gln Ala Ser Arg Ser Glu Lys Val Thr Ile Ser Tyr Leu Ser
 260 265 270
 Glu Asp Tyr Trp Lys Ser Lys Met Thr Gly Ile Arg Arg Phe Asp Asn
 275 280 285
 Leu Thr Ile Pro Lys Glu Asn Pro Ile Val Ser Glu Ala Thr Leu Tyr
 290 295 300
 Val Gly Glu Val Pro Tyr Lys Gln Gly Gly Val Thr Pro Glu Thr Gly
 305 310 315 320
 Phe Asp Thr Ala Gly Phe Val Gln Tyr Val Tyr Gln Lys Ala Ala Gly
 325 330 335
 Ile Ser Leu Pro Arg Tyr Ala Thr Ser Gln Tyr Asn Ala Gly Thr Lys
 340 345 350
 Ile Lys Lys Ala Asp Leu Lys Pro Gly Asp Ile Val Phe Phe Gln Ser
 355 360 365
 Thr Ser Leu Asn Pro Ser Ile Tyr Ile Gly Asn Gly Gln Val Val His
 370 375 380
 Val Thr Leu Ser Asn Gly Val Thr Ile Thr Asn Met Asn Thr Ser Thr
 385 390 395 400
 Tyr Trp Lys Asp Lys Tyr Ala Gly Ser Ile Arg Val Gln
 405 410

【0085】

<210> 3
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer
 <400> 3
 ggatccgtta aaactgcaaa aagagg

【0086】

29

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

tttctcgagt tgcacccgta tacttc

26

【0087】

10

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

cttggatgga gaactgtacc tg

22

【0088】

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

ggcgctgaaa ttaggtgctg

20

【図面の簡単な説明】

【図1】 YwtD単独、GGT単独およびYwtD、GGT共存によるポリーγ-グルタミン酸分解反応をニ
ンヒドリン法にて経時的に分析した結果を示す図であ
る。

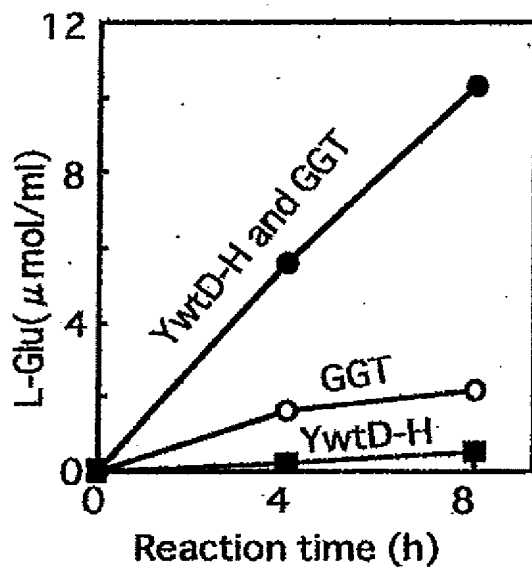
【図2】 YwtDによるポリーγ-グルタミン酸分解
反応において、分解産物の分子量変化を経時的に分析し

た結果を示す図である。

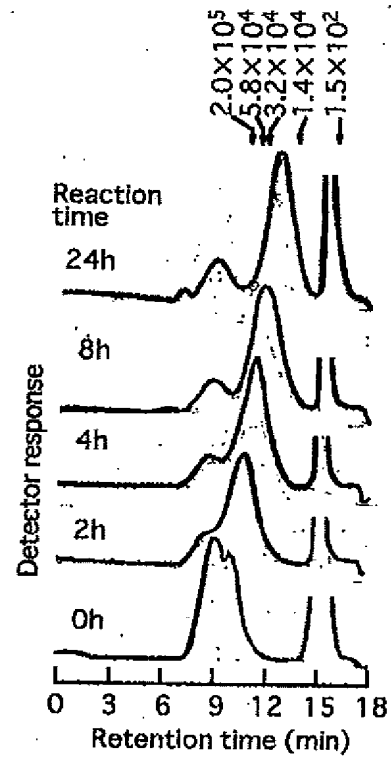
【図3】 GGTによるポリーγ-グルタミン酸分解反
応において、分解産物の分子量変化を経時的に分析した
結果を示す図である。

【図4】 YwtD、GGT共存によるポリーγ-グル
タミン酸分解反応において、分解産物の分子量変化を経
時的に分析した結果を示す図である。

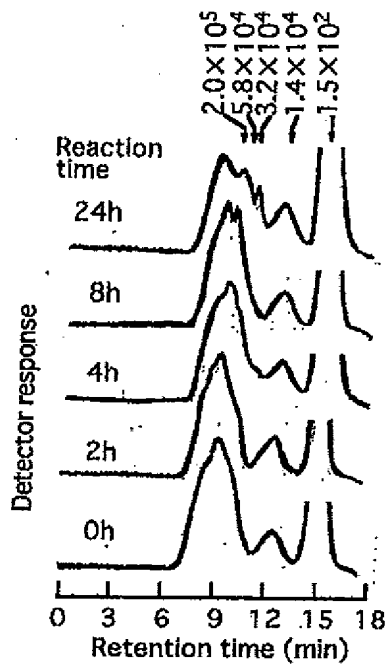
【図1】



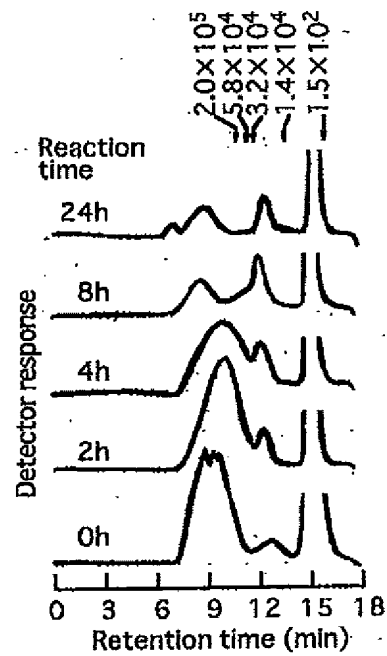
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	タームコード(参考)
C 1 2 R 1:125)			

F ターム(参考) 4B024 AA03 BA14 BA80 CA03 CA06
 CA07 CA20 DA06 DA07 EA04
 GA11 GA19 GA25 HA03
 4B050 CC01 CC04 CC05 DD02 FF03E
 FF11E FF14E LL03 LL05
 4B064 AE03 CA02 CA19 CC01 CC24
 DA01 DA10 DA11 DA16
 4B065 AA19X AA19Y AA26X AB01
 AC14 AC20 BA02 BA16 BA30
 BB01 BB03 BB12 BB20 BC02
 BC03 BC26 BD01 BD14 CA41
 CA43 CA44 CA46 CA50